Lane Medical Library

Aus der medizinischen Klinik der Universität Gießen
(Direktor: Professor Dr. Bohnenkamp)

Beiträge zur Absorption des Harns im Ultraviolett

STANFORD UNIV

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexanders-Universität zu Erlangen

vorgelegt von

Hans-Guido Schmidt
appr. Arzt
aus Smejnogorsk (Sibirien)

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juni 1937

Buchdruckerei Max Döres, Erlangen, Rückertstraße 1
1937

938/20

Referent: Univ.-Professor Dr. Greving

Dekan: Univ.-Professor Dr. Greving

In Dankbarkeit meinen lieben Eltern!

Die vorliegende Arbeit wurde in der Gießener medizinischen Klinik ausgeführt; sie soll einen Teil der Untersuchungen bilden, die Herr Professor Dr. Bohnenkamp zusammen mit Herrn Dr. Fritz Bandow und mit der Unterstützung der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft in Gang setzte und die sich mit den optischen Eigenschaften von physiologischen Flüssigkeiten befassen.

Es ist mir eine angenehme Pflicht meinem hochverehrten Lehrer an dieser Stelle meinen Dank auszusprechen für die Anregungen zu dieser Arbeit und das mir bewiesene Wohlwollen. — Ebenso bin ich Herrn Dr. Fritz Bandow für seine weitgehende Hilfe, vor allem bei sämtlichen optischen Arbeiten, zu Dank verpflichtet.

Der benutzte Quarzspektrograph ist eine Leihgabe der deutschen Forschungsgemeinschaft.

Einleitung.

Untersuchungen über die Absorption des Lichtes im sichtbaren und unsichtbaren Teil des Spektrums (Spektrophotometrie) sind besonders in den letzten 15 Jahren in wachsender Zahl vorgenommen worden. Neben der Chemie, der sie ganz neue Wege in der Molekularforschung wiesen, fanden sie auch in der Medizin große Beachtung; erst in der letzten Zeit hat L. Heilmeyer in seiner med. Spektrophotometrie [1]) in umfassender Weise die Ergebnisse seiner Untersuchungen dargelegt.

Von allgemeiner Bedeutung sind auch die Untersuchungen, die sich auf eine qualitative Bestimmung von Farbstoffen erstrecken, wobei Gemische zweier oder sogar dreier Farbstoffe für einen Nachweis nebeneinander kein Hindernis bilden. Als Farbstoffe sind hier nicht nur die im Sichtbaren absorbierenden Substanzen anzusehen, sondern auch die in diesem Wellenbereich farblosen Stoffe, deren Absorption vielmehr erst im Ultraviolett beginnt. Außer diesem qualitativen Anwendungsbereich besitzen wir in der Spektrophotometrie noch eine vorzügliche Methode der Konzentrationsbestimmung eines Farbstoffes, die sich in ihrer Genauigkeit mit der besten andersartigen Untersuchungsmethode messen kann. Wohl sind auch diesem Gebiete physiologischer Forschung Grenzen gezogen, nämlich dann, wenn an Stelle einer selektiven, d. h. auf enge und umschriebene Bezirke des Spektrums beschränkten Absorption eine verwaschene, also über eine größere Breite des Spektrums verlaufende auftritt; dann ist natürlich eine Analyse stark erschwert, wenn nicht ganz unmöglich. Dazu kommt, daß in den Körperflüssigkeiten häufig viele Stoffe verschiedener Herkunft, aber ähnlicher Eigenschaften vorliegen, deren Absorptionen sich überlagern und eine Trennung der einzelnen Bestandteile erheblich beeinflussen.

Physikalische Methode.

Grundlegend für die gesamte Spektralphotometrie ist das sog. Absorptionsgesetz; es handelt von den Intensitäten eines Lichtstrahles vor und nach Durchtritt durch ein Medium. Man

bezeichnet die Intensität des Lichtstrahles, der in ein durch planparallele Flächen begrenztes Medium einfällt mit J_o und mit J_I diejenige Intensität, die das Licht noch nach Durchtritt durch 1 cm Schichtdicke besitzt. Für eine Schichtdicke von n cm lautet dann die Gleichung:

$$J = \left(\frac{J_I}{J_o}\right)^n.$$

Die Absorption einer Flüssigkeit ist also abhängig von der Dicke der Schicht, die der Lichtstrahl zu durchlaufen hat (Lambert'sches Gesetz) und zweitens, wie Beer fand, im selben Verhältnis von der Konzentration. Als Ursache für diese Lichtschwächung sind Schwingungen der in der Lösung vorhandenen Moleküle anzusehen, die je nach Form und Bau verschiedene Absorption hervorrufen. Dabei bleibt es für den endgültigen Effekt gleichgültig, ob die Konzentration oder die Schichtdicke verändert wird; es kommt bei Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes nur auf die Zahl der absorbierenden Moleküle an. Demnach ist die aus einer absorbierenden Lösung austretende Lichtintensität bei d cm Schichtdicke und der Konzentration c gleich

$$\left(\frac{J_{dc}}{J_o}\right) = \left(\frac{J_I}{J_o}\right)^{dc}.$$

Schreibt man nun zur Vereinfachung der Gleichung den Ausdruck $\frac{J_I}{J_o}$ als eine Potenz von 10, so werden die Exponenten, da $\frac{J_I}{J_o}$ stets kleiner als 1 sein muß, ein negatives Vorzeichen tragen. Bezeichnet man nun weiter $\frac{J_{dc}}{J_o} = 10^{-E}$, und $\frac{J_I}{J_o} = 10^{-e}$, dann erhält man aus obiger Gleichung $10^{-E} = 10^{-e}$, was aber nichts weiter ist als $E = e.d.c$ oder $e = \frac{d.c}{E}$.

Hierbei bedeutet E die Extinktion; bezieht man dieselbe auf die Einheit der Schichtdicke, so nennt man sie den Extinktionskoeffizienten (nach Bunsen).

Unter einem spezifischen Extinktionskoeffizienten versteht man seine Beziehung zur Konzentration.

Noch eine andere Beziehung von e kann man bei solchen Untersuchungen heranziehen:

$$-\log \frac{J_d}{J_o} = \log \frac{J_o}{J_d} = e.d; \text{ daraus ergibt sich:}$$

$e = \log \frac{J_o}{J_d} \cdot \frac{1}{d}$ oder, setzt man $\log \frac{J_o}{J_d} = 1$, dann wird $J_d = 1/d \cdot J_o$ und damit $e = \frac{1}{d}$; benützt man jetzt die Logarithmen und setzt die gefundenen Werte in die Gleichung von e ein, dann entsteht folgende Gleichung:

$$\log e = \log \frac{1}{d} - \log (\log \frac{J_o}{J}).$$

Näheres ist in den einschlägigen Lehrbüchern nachzulesen.

Zur Vereinfachung der Ausrechnung von e folgende Tabelle: sie bringt die Werte für e bei einer Sektoreinstellung von 120^0, d. i. J zu $J_o = 1:3$.

Uebersichtstabelle
für E und log E bei einigen Schichtdicken.
Mit dekatischem Logarithmus berechnet.

Schichtdicke cm	log E	E
0,05	+ 0,98	9,5
0,10	+ 0,68	4,8
0,20	+ 0,38	2,4
0,40	+ 0,08	1,2
1,10	— 0,36	0,44
2,00	— 0,62	0,24
3,60	— 0,88	0,13
5,00	— 1,02	0,095

Ein Wort noch zu den graphischen Darstellungen. Wir haben sie so gewählt, daß wir unabhängig von den Konzentrationsverschiebungen bzw. von Veränderungen der durchstrahlten Schicht blieben; die Kurven werden dann nur in ihrer Höhenlage verschoben sein. Man erreicht durch diese Anordnung, daß die Kurve nur durch die Natur der verschiedenen Farbstoffe bedingt wird und als typische Farbkurve in Erscheinung tritt; durch planparallele Verschiebung zur Deckung zu bringende Farbkurven weisen auf eine einheitliche Abstammung hin.

Zu den Aufnahmen wurde von uns folgende, nach dem Vorbild von Scheibe aufgebaute Anordnung benutzt:

Als Lichtquelle diente eine Funkenstrecke zwischen Wolframstäben, die horizontal und vertikal zu verschieben waren und durch ihre geringe Abnützung eine größere Festigkeit der

Einstellung sicherten. Anschließend wandelte eine Quarzsammellinse das ausgesandte Licht in planparallele Strahlen um; die eine Hälfte des Lichtes durchstrahlte die zu untersuchende Flüssigkeit, während die andere durch einen eingebauten, rotierenden Sektor auf einen bestimmten Intensitätsgrad abgeschwächt wurde. Ein kleiner Elektromotor trieb ihn an; seine Umdrehungen sollen 100—120 in der Minute betragen. Außerdem ist in diesem Lichtweg noch eine Quarzscheibe eingeschaltet. Die zu untersuchende Flüssigkeit befand sich in einem Balyrohr, dessen verschiebbarer Stempel bei Lupenablesung eine genaue Einstellung gestattete. Beide Strahlenbündel gelangten dann zu einem Hüfnerprisma, welches die beiden Strahlen so gut aneinander bringt, daß eine genaue Ablesung ermöglicht war; die Fehlerquellen der alten Methode, bei der man nach jeder einzelnen Bestimmung das Vergleichsspektrum neu aufnehmen mußte, wurden dadurch auf das Mindestmaß herabgedrückt. An dem Quarzspektrographen (QB von Steinheil, München) befand sich ein senkrechter Spalt, dessen Breite mittels einer Trommel bis auf 0,01 mm genau eingestellt werden konnte (unsere Einstellung betrug 0,10 mm). Eine wagrecht angebrachte keilförmige Blende grenzte die Höhe des Spektrums ab. Die Kassette der Platten war durch eine Vorrichtung so zu verschieben, daß man ungefähr 40 Doppelaufnahmen untereinander anfertigen konnte. Zu Anfang und Ende einer jeden Platte nimmt man zur Festlegung der Wellenlänge das Spektrum einer Quecksilberlampe auf, wodurch eine bequeme Auswertung des Spektrums ermöglicht wird. Notwendig ist es vor und nach der Untersuchung eine Leeraufnahme anzufertigen, auf der beide Teile des Spektrums gleiche Schwärzung aufweisen müssen. Wir benützten hierbei je nach Einstellung des Sektors die Belichtungszeit, die sich aus der Errechnung der benutzten Aufnahmezeit (in unseren Fällen 30 sec) mal $\frac{J}{J_0}$ ergibt; das sind

$$\frac{30}{3} = 10 \text{ sec.}$$

Trotz der von Dannmeyer und anderen Autoren gefundenen Fehlerquellen gebrauchten wir diese photographische Methode. Wir konnten die festgestellten Nachteile nur in geringem Maße bestätigt finden, wenigstens in dem von uns verwandten Material. Trotz längerer und wiederholter Bestrahlung zeigten die Absorptionskurven untereinander keine erkennbaren Unrerschiede; außerdem spielten bei unseren Untersuchungen quantitave Auswertungen nur eine geringe Rolle, sodaß bewust

mit einer größeren Sektoreinstellung als üblich gearbeitet wurde. Der dabei auftretende Fehler[2]) wurde wegen der besseren Lichtintensität mit in Kauf genommen, die Lösungen aber einer zu langen Bestrahlungszeit enthoben; ein weiterer Vorteil besteht noch darin, daß man dadurch im Stande ist etwas schwächere Absorptionen nachzuweisen.

Chemische Methode.

In der bereits erwähnten med. Spektrophotometrie von L. Heilmeyer finden wir bei der Besprechung des ultravioletten Anteils der Harnabsorption die Angabe, daß die Farbkurve eines jeden Urins ein Maximum bei 2850 Ä mit einem nachfolgenden Minimum bei 2550 Ä aufweist. Dieser Absorption nachzugehen, war der eigentliche Grund dieser Arbeit; die hierbei gefundenen Ergebnisse und Erfahrungen seien im folgenden mitgeteilt.

Sieht man die einschlägige Literatur über spektrophotometrische Untersuchungen an chemischen Stoffen durch, so ist man überrascht über die Menge der an dieser Stelle absorbierenden Substanzen. Zu Beginn der eigentlichen Untersuchungen sei darüber kurz das wichtigste vorausgeschickt.

H. Ley[3]) zeigt in seinen Berichten, daß das Absorptionsvermögen, abgesehen von der später zu besprechenden Konstitution der einzelnen Stoffe, meist stark abhängig von der Art des Lösungsmittels ist und zwar verschiebt ein Lösungsmittel die Absorptionsbanden eines gelösten Stoffes um so mehr nach längeren Wellenlängen je größer sein Brechungsvermögen ist; oft handelt es sich auch um Wechselwirkungen zwischen gelöstem Stoff und Lösungsmittel oder um elektrostatische Anziehungen zwischen den Molekülen der beiden. Dabei bleibt es zunächst ganz gleichgültig, ob daraus definierte chemische Verbindungen entstehen oder nicht (was übrigens auch die Kundt'sche Regel[4]) aussagt). Ueberprüfungen der aufgestellten Reihenfolge der Lösungsmittel haben sich nicht vermeiden lassen, da sich im Laufe der Zeit Aenderungen herausgestellt haben. Außerdem hängt die Gültigkeit dieser Gesetze von der Polarität eines Stoffes oder Lösungsmittels ab, d. h. davon, ob die Verteilung der elektrischen Ladung völlige Symmetrie aufweist oder ob dieselbe nicht vorhanden ist; Temperatureinflüsse sind weniger wichtig.

Für die Farbe eines Stoffes macht man bekanntlich gewisse Atomgruppen verantwortlich, denen man als Farbträger das Beiwort „chromophor" gegeben hat, und deren geeignete Ein-

führung in farblose Moleküle sich die Farbstoffchemie zur Darstellung von Farben bedient. Es sind Gruppen, die folgende Konstitution besitzen:

z. B.	Aethylen	$-C=C-$
	Carbonylgruppen	$=C=O$
	Stickstoff-Kohlenstoffgruppen	$=C=NR$
	Nitrogruppen	$-N\begin{matrix}=O\\=O\end{matrix}$
	Benzolgruppen	C_6H_5- usw.

Auch im nichtsichtbaren Teil des Spektrums geben viele dieser chromophoren Gruppen, vor allem die obengenannten, eine starke selektive Absorption, wobei sich für unsere Untersuchungen besonders die Carbonyl- und Benzolgruppen wichtig zeigten, weil sie in das Gebiet der zu untersuchenden Wellenlängen hereinfallen. Die aliphatischen Kohlenwasserstoffe (Alkohole usw.) absorbieren mehr im Bereich der kürzeren Wellenlängen, wirken also bei Untersuchungen, die das Gebiet um 2850 Å betreffen, nicht störend. Einbasische Säuren der aliphatischen Reihe verhalten sich ähnlich; bei mehrbasischen ist die Entfernung der COOH-Gruppen voneinander maßgebend für Lage und Stärke der Absorption. Die Absorption des Benzols [6]) liegt bei 2700 und 2300 Å; Einführung von gesättigten und ungesättigten Radikalen hat eine mehr oder weniger große Verschiebung der Absorption nach den längeren Wellenlinien zur Folge.

Bereits diese kurzen Ausführungen zeigen, wie mannigfaltig die Deutung der Absorption bei 2850 Å sein kann; ist doch der Urin nichts anderes als ein Spiegelbild aller beim Stoffwechsel ablaufenden Reaktionen, dessen Produkte in großer Zahl und nur immer in wieder anderer Zusammensetzung die eine oder andere Gruppe enthalten. Dazu kommen noch Schwierigkeiten in der Auswahl eines geeigneten Lösungs- oder Fällungsmittels, da viele wegen ihrer Eigenabsorption nicht verwandt werden können.

Ueber sie ist folgendes zu sagen: Zu gebrauchen sind einmal neben aqua dest. die Säuren HCl und H_2SO_4; HNO_3 absorbiert bei ca. 3000 Å und würde das gesuchte Gebiet überdecken. (Genauere Daten sind aus den Tabellen von Landolt-Börnstein zu entnehmen [7]). Als Lösungsmittel gebrauchten wir auch häufig Salzlösungen, von denen sich besonders $(NH_4)_2\ SO_4$, NH_4Cl, $NaHCO_3$, Na_2CO_3 und NaCl bewährten, da sie bei

2850 Å keine Absorption zeigen. Sehr beschränkt waren wir nur in der Auswahl organischer Reagentien, da hier eine Benutzung im Sinne obiger Ausführungen von der Konstitution der einzelnen Verbindungen abhängig ist. Benzol und Aceton sind z. B. unbrauchbar, da ihre Eigenabsorption gerade in das Gebiet der gesuchten Wellenlänge hereinfällt, wie eine Kontrollaufnahme schnell zeigen kann. Aether und Chloroform sind zu verwenden, ebenso wie Methyl- und Aethylalkohol, während bei den höheren Homologen der Alkoholreihe eine deutliche und daher störende Absorption auftritt.

Fällungsmittel.

Bei dem Gebrauch dieser Reagentien begegnen wir natürlich denselben Schwierigkeiten wie in der eben besprochenen Gruppe. Man arbeitet ja meistens zur Erzielung einer Fällung mit Salzen der Schwermetalle, die man aber bei Versuchen im ultravioletten Licht infolge ihrer Eigenabsorption nicht verwenden kann. Es handelt sich dabei vorzugsweise um die Salze der Phosphorwolframsäure und des Bleis sowie um die Vanadate. Wir haben zwar wiederholt den Versuch gemacht die Metalle nach beendeter Fällung wieder zu entfernen; meistens ging es aber nur auf Kosten der gesuchten Substanz oder der störende Stoff ließ sich nicht einmal restlos entfernen, sodaß eine sichere Bestimmung des gesuchten Körpers nicht einwandfrei durchzuführen war.

Versuche, die sich in der Richtung bewegten, Harn für ultraviolettes Licht durchgängig zu machen, scheiterten an dem Mangel geeigneter Adsorptionsmittel; es handelte sich dabei darum die Polarisationsverhältnisse zuckerhaltiger Urine im Ultraviolett zu studieren. Die sonst gebräuchlichen Bleisalze sind erklärlicherweise unbrauchbar; wir versuchten dann mittels Kohle weiter zu kommen, aber einmal hält die Kohle auch bei Zusatz von HCl [8]) noch zuviel Zucker zurück, andererseits vermag sie nicht den Harn völlig absorptionsfrei zu machen. Eine längere Einwirkung des Kohle/Salzsäuregemisches auf den Urin war nur von einem größeren Zuckerverlust begleitet ohne aber dem gewünschten Ziele näher zu kommen. Die besten Resultate erzielten wir noch mit dem uns von der Fa. Heyden zur Verfügung gestellten Präparate „Heyden 977", — für das Entgegenkommen der Fa. möchte ich auch an dieser Stelle bestens danken —; es handelt sich hierbei um die wirksamen Bestandteile des im Handel befindlichen Präparates „Adsorgan", das nach Entfernung der aromatischen und versüßenden Anteile aus

20 % Argocarbon und 80 % Silargol besteht (Heyden 779 ist selbst nicht im Handel erschienen). Mit dieser Substanz gelang es die Restabsorption sehr stark herunterzudrücken, wenn auch völlige Absorptionsfreiheit nicht erzielt werden konnte. Am weitesten fand man sie nach 12stündiger Einwirkung fortgeschritten. Wahrscheinlich ist die Stärke der auftretenden Restabsorption abhängig von der schwankenden Menge eines Farbstoffchromogens, das erst durch den Luftsauerstoff zu einem absorbierenden Farbstoff umgewandelt wird. Eine ideale, daher verwendungsfähige Methode den Harn ganz absorptionsfrei zu machen wurde jedoch nicht gefunden.

Im großen und ganzen bleibt man auf die Verwendung von Salzlösungen wie NH_4Cl, $(NH_4)_2 SO_4$ (in wechselnder Konzentration) u. a. sowie von NaOH z. B. als Fällungsmittel angewiesen.

Spezieller Teil.

Die von verschiedenen Autoren unternommenen Untersuchungen an Körperflüssigkeit wie z. B. am Blutserum hat im Vergleich zu den beim Harn gefundenen Ergebnissen die berechtigte Vermutung aufkommen lassen, daß als Ursachen verwandte, wenn nicht gleiche chemische Verbindungen für die Absorption in Frage kommen; dafür sprechen auch gleichlaufende Untersuchungsergebnisse an Transsudaten, Exsudaten und am Liquor. Verantwortlich sind auch hier die oben genannten chromophoren Atomgruppen zu machen, worunter vor allen die zyklischen Aminosäuren zu nennen sind.

Um nun wenigstens einige Stoffe von der Fülle der im Harn auftretenden Stoffwechselprodukte voneinander zu trennen, wurde der Harn zuvor einer einfachen Fraktionierung unterzogen. Setzt man nämlich dem Urin in steigender Menge Ammoniumsulfat zu, so fällt bei steigender Konzentration an Ammoniumsulfat ein Teil derselben aus, die man durch Abfiltrieren trennen kann. Diese Art der Isolierung ist zwar grob, ergibt aber durch die Abzeichnung der jeweils typischen Farbstoffkurve einen gewissen Einblick in die vorliegenden Substanzen; bei Bedarf kann man dann die einzelnen Fraktionen noch weiter trennen.

Man findet dann im Niederschlag:

1. Die Harnsäure
2. Die Harnfarbstoffe und ihre Abkömmlinge (sog. rote Farbstoffgruppe)

a) Die Gallenfarbstoffe
b) Die Blutfarbstoffe

3. Die Eiweißkörper (Globuline und Albumine, bei verschiedener Salzkonzentration ausfallend).

Von der Fällung nicht betroffen:

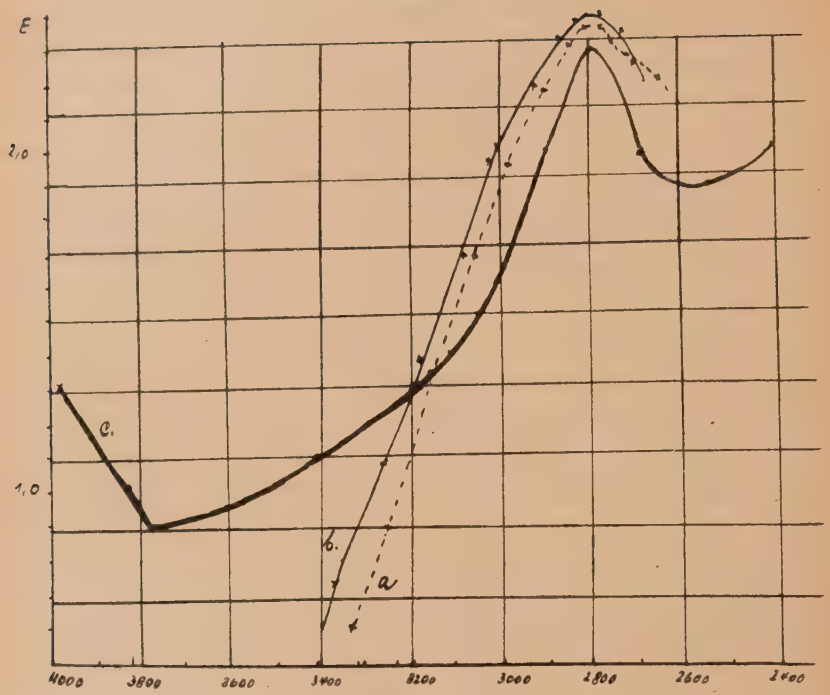
4. Die Restfarbstoffe wie Urochromogen mit seinen Vorstufen; außerdem das Urorosein, Uroerythrin usw.
5. Die anorganischen Bestandteile.

Die zuletzt genannte Gruppe ist am schnellsten besprochen. Kontrollversuche, die mit einer Lösung der im Harn vorkommenden anorganischen Verbindungen gemacht wurden, zeigten, daß ihre Absorption erst ganz im Kurzwelligen auftritt. Schwermetalle kann man, sollten sie einmal vorhanden sein, wegen ihrer geringen Werte unberücksichtigt lassen; außerdem spricht gegen die Annahme einer anorganischen Ursache für die Absorption bei 2850 Ä die Tatsache, daß bei Zugabe von Kaliumpermanganat diese Absorption verschwindet und einer schwachen Endabsorption Platz macht. Außerdem war schon rein überlegungsgemäß für die anorganischen Substanzen an dieser Stelle keine Absorption zu erwarten, da die meisten von ihnen erst am Ende des kurzwelligen Spektrums absorbieren.

Die Harnsäure.

Wenden wir uns zunächst der unter 1 angegebenen Substanz zu. U. E. ist die Harnsäure die Hauptursache für das Zustandekommen des erwähnten Absorptionsmaximus, wie auch G. Huwer [9]) in seiner Arbeit annimmt. Die von uns ausgeführten Modellversuche mit Uraten, gelöst in Wasser bezw. Salzsäure, zeigen eine stark selektive Absorbtion bei 2850 Ä, wie aus Abbildung 1 (umstehend!) ersichtlich wird. Schon von vorneherein läßt die Struktur der Harnsäure mit ihrem Purinring, den C = O - Gruppen und der Kohlenstoffdoppelbindung das Auftreten einer starken Absorption vermuten. Behandelt man die Harnsäurelösungen mit Kaliumpermanganat, so verschwindet die Absorption. Als Endprodukt der Harnsäureoxydation [10]) nimmt man das Allantoin an, das, wie die Untersuchung von E. Gaber [11]) ergeben hat, von 2300 Ä an keine meßbare Absorption mehr hervorruft. In der gleichen Arbeit wurden die störenden Verhältnisse der Harnsäure im Blutserum beschrieben, die, bis auf die Lösung die Harnsäure

Abb. 1



a) Urate, gel. in H_2O; b) Urate in HCl;
c) NaOH-Niederschlag des Harns gel. in Alkohol/Salzsäure.

durch Fermente zu spalten, die gleichen Schwierigkeiten bei der Untersuchung des Serums im Ultraviolett hervorrief. Ob bei der Oxydation der Harnsäure der Abbau noch weiter ging, ließ sich aus den aufgenommenen Kurven nicht herauslesen, da evt. auftretende Oxalsäure oder Kohlensäure sowie Harnstoff keine Absorption bei 2850 Å zeigen.

Daß im Harn die Harnsäure einen Großteil der zu untersuchenden Absorption ausmacht, zeigt auch das Verschwinden des Absorptionsmaximums nach Behandlung mit Ammoniumsulfat, wobei die Harnsäure im Niederschlag zu suchen ist. Daß die Harnsäure im Urin restlos ausgesalzen wird nach Behandlung mit Ammoniumsulfat, läßt sich in einer Probe leicht nachweisen. Zwar fallen daneben auch die Eiweißkörper aus; ihr Anteil an der Absorption steht aber schon rein mengenmäßig hinter der der Harnsäure zurück.

Uebrigens begegnet man noch bei einer anderen Arbeitsweise diesem Absorptionsmaximum. Es handelt sich dabei um den spektroskopischen Nachweis von Porphyrin im Harn, dessen Arbeitsgang hier kurz angeführt sei.

Nach Garrod werden zu 200 ccm Urin 40 ccm einer 10 % Natronlauge zugesetzt; den ausfallenden Niederschlag von Phosphaten läßt man absitzen, digeriert den überstehenden Harn von ihm ab und zentrifugiert bei mehrfachen Waschen mit dest. Wasser und absolutem Alkohol. Der Niederschlag ist dann meist noch etwas durch Harnfarbstoffe gefärbt und läßt sich in einigen ccm einer 10 % Salzsäure/Alkohol-Lösung auflösen; dabei wird das Porphyrin mitgelöst und läßt sich spektroskopisch bestimmen. Bei der Auswertung der Aufnahmen findet man neben der ganz typischen und mehr im langwelligen Teil des Spektrums liegenden Absorption des Porphyrins (4000 Ä) sowohl im normalen wie im pathologischen Urin bei 2850 Ä eine gut erkennbare und abgrenzbare Lichtschwächung. Es ist anzunehmen, daß auch hierfür die Harnsäure verantwortlich zu machen ist; durch die Zugabe von Natronlauge wird im Harn eine Aenderung des elektrostatischen Gleichgewichtes, das zur „Lösung" dieses Stoffes notwendig sein muß, gestört. Es kommt dadurch zur Ausfällung eines Teiles der Harnsäure, die dann in der Alkohol/Salzsäurelösung erscheint. Die Reindarstellung des Körpers zur Sicherung dieser Annahme war leider nicht möglich, sodaß eine Mitbeteiligung anderer Körper nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte. Eigenschaften dieser Absorption, auch im Bilde klinischer Erkrankungen, sind von E. Ziegler [12]) beschrieben worden.

Zur weiteren Klärung der Absorption, vor allem aber um einen Einblick über die Beeinflussung derselben durch andere Harnbestandteile zu erhalten, wurde der Harn einer fraktionierten Bearbeitung mit mehreren Salzlösungen unterzogen. Dadurch läßt sich auch eine gewisse Anreicherung der Fraktionen mit den jetzt zu besprechenden Farbstoffen erzielen. Es ist übrigens anzunehmen, daß, nach den vorliegenden Ergebnissen über die Harnfarbstoffuntersuchungen und den auch von uns gemachten Erfahrungen, mit dem Vorliegen gewisser Vorstufen zu rechnen ist; jedenfalls erhielten wir öfters aus Fraktionen, aus denen — nach dem Spektrogramm wenigstens — der Farbstoff eliminiert schien, je nach Fall bei Reduktion oder Oxydation der Restlösung wieder eine typische Kurve der entfernten Farbstoffe. Inwieweit diese Vorstufen die Absorption im Ultraviolett beeinflussen, läßt sich noch nicht sagen; außerdem ließ sich diese Annahme nicht verallgemeinern.

Entstanden sind die Harnfarbstoffe letzten Endes aus den Blutfarbstoffen und aus Abbauprodukten des Eiweißstoffwechsels, wie z. B. das Urochromogen.

Die Gallenfarbstoffe und ihre Abkömmlinge.

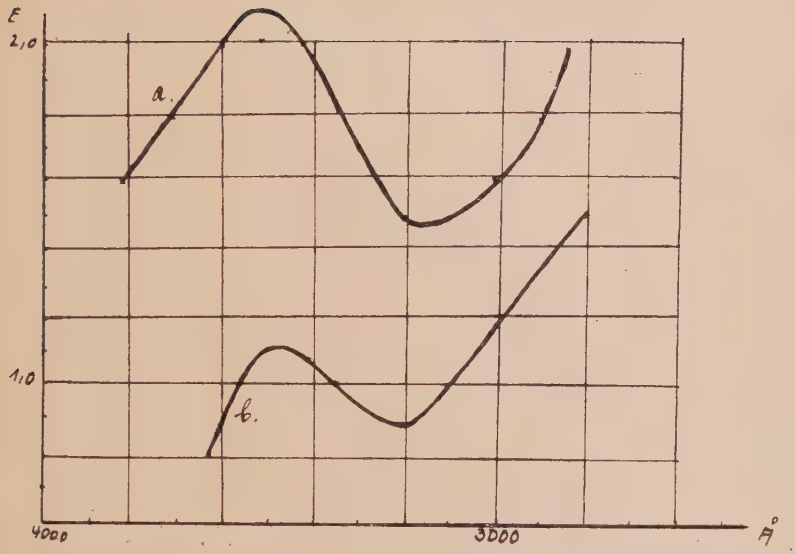
Das Auftreten dieser Harnfarbstoffe ist stets mit krankhaften Ursachen verknüpft, wenigstens dann, wenn sie mit den gewöhnlichen Methoden nachweisbar sind; nach Untersuchungen von Obermeyer und Popper [13]) sollen sie jedoch auch im normalen Harn in geringen Mengen vorkommen. Zur spektroskopischen Bestimmung der Gallenfarbstoffe benutzten wir einen Urin, der schon durch seine dunkelbraune Farbe einen reichlichen Gehalt an diesen Stoffen verriet. Wir behandelten ihn mit Ammoniumsulfat, sodaß wir im Niederschlag die Gallenfarbstoffe Bilirubin, Biliverdin und Biliprasin nebeneinander erhielten, die durch ihr verschiedenes Verhalten Lösungsmitteln und anderen chemischen Agentien gegenüber zu trennen sind. So sind die beiden erstgenannten durch Chloroform zu trennen, während Biliverdin und Biliprasin mit Natronlauge verschieden reagieren; Biliprasin gibt dabei einen Farbumschlag in Braun.

Biliverdin.

Es ist ein dunkelgrünes, amorphes Pulver, unlöslich in Wasser, Aether und Chloroform; löslich in Aethylalkohol, Eisessig und konzentrierter Salzsäure, während es von verdünnter Salzsäure wieder ausgefällt wird. Bei der spektroskopischen Untersuchung des alkoholischen Auszuges erhielten wir bei 3550 Ä eine starke selektive Absorption mit einem darauffolgenden Minimum von 3200 Ä; dann bog die Kurve wieder um und verlief ohne sichtbares Maximum steil aufwärts (s. Abb. 2 umstehend!). Auch der Versuch durch Verdünnung ein etwa verborgenes Maximum aufzudecken, führte nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Wir nahmen daher an, daß das Biliverdin in keinem Zusammenhang mit der Absorption bei 2850 Ä steht.

Zufällig begegneten wir einer gleichen Absorption wie der des Biliverdins bei einer Porphyrinbestimmung, ohne daß sich aber der Farbstoff qualitativ im Urin hatte nachweisen lassen. Leider gelang es uns nicht mehr in den folgenden Untersuchungen diese Absorption wieder zu finden, sodaß wir möglicherweise nur irgend ein Abbauprodukt eines Heilmittels nachgewiesen haben, was nicht mehr festzustellen war.

Abb. 2



a) Biliverdin conc. Lsg.; b) Biliverdin verd. Lsg. gel. in Alkohol.

Bilirubin und Biliprasin wurden nur in ihren Anfängen untersucht; soweit sich aber diese Untersuchungen überblicken lassen, zeigen sie keine Beziehungen zu der Absorption bei 2850 Å. Außerdem kommen sie nur in pathologischen Harnen vor und lassen daher eine nähere Betrachtung in diesem Zusammenhang unnötig erscheinen.

Urobilin und Urobilinogen.

Als Abbauprodukte der Gallenfarbstoffe treten diese Stoffwechselprodukte nur bei gestörter Lebertätigkeit vermehrt im Urin auf, also ebenfalls unter pathologischen Bedingungen; ein wesentlicher Einfluß auf die ziemliche Konstanz zeigende Absorption kann daher schon von vorneherein ausgeschlossen werden.

Heilmeyer [1]) gibt in seinen Ausführungen bereits die Absorptionsmaxima dieser Verbindungen an; sie liegen im sichtbaren Teil des Spektrums und zeigen dabei eine ganz charakteristische Form. Wir konnten im großen und ganzen nur diese Befunde bestätigen. Genauere Untersuchungen im Ultraviolett ließen sich nur im Rahmen der anderen Untersuchungen führen;

wir konnten aber soviel erkennen, daß auch diese Verbindungen keine selektive Absorption bei 2850 Ä zeigten. Selbst bei Harnen, in denen die Schlesinger'sche und Ehrlich'sche Reaktion stark positiv ausfiel, wurde keine Aenderung der Absorption gefunden.

Die Blutfarbstoffe.

Auch sie treten nur unter Bedingungen auf, die eine Beeinflussung der gesuchten Absorption im normalen Harn unwahrscheinlich machen. Um aber nachzuprüfen, ob und in welcher Weise bei Anwesenheit von Blutfarbstoffen eine Ueberlagerung eintritt, wurden Untersuchungen durchgeführt.

Bei der spektrophotometrischen Prüfung der salzsauren Lösungen von Hämatin lassen sich die Untersuchungen von Heilmeyer[1]) und anderen Autoren[14]) bestätigen; auch wir fanden zwischen 3900 Ä und 3600 Ä ein breites Maximum. Das bei 2700 Ä folgende muß wohl auf das Vorhandensein von Globulin zurückgeführt werden. Einmal fanden wir in einem stark bluthaltigen Urin eine geringe Erhöhung des Maximums bei 2850 Ä, wobei sich Ursache und Grund nicht genau trennen ließ; die Erhöhung ließe sich genau so gut durch einen stärkeren Gehalt an Harnsäure erklären wie durch eine Eiweißabsorption.

Die Porphyrine.

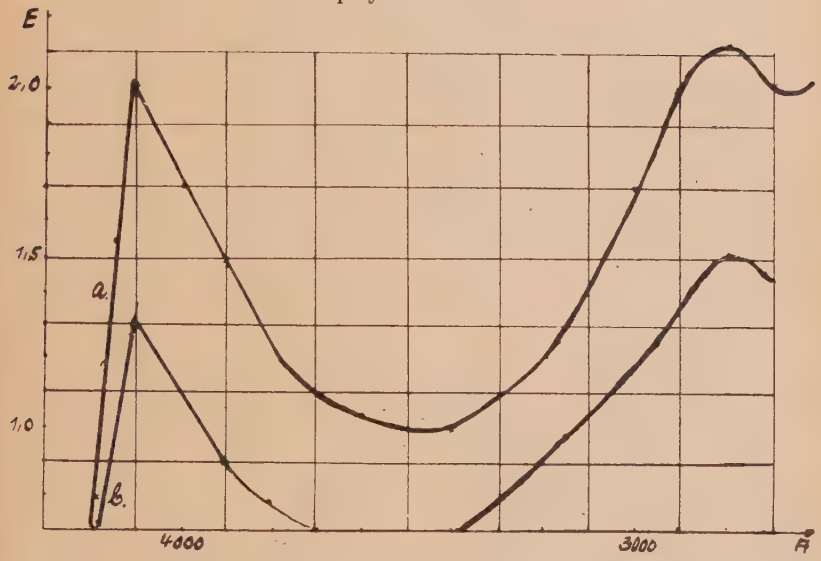
Das Uro- und Koproporphyrin sind beide als eisenfreie Spaltprodukte des Blutfarbstoffes aufzufassen; sie sind im Urin des Gesunden nur in sehr geringen Mengen (pro Tag 30—100 γ %) vorhanden. Vermehrt ist ihre Ausscheidung bei manchen Lebererkrankungen (besonders bei bestimmten Formen des Ikterus) und bei der perniciösen Anämie sowie bei übermäßigen Gebrauch von Schlafmitteln (Sulfonal, Trional, Medinal und Luminal) und bei Bleivergiftungen; besonders bei der letzten Erkrankung wurde die Porphyrinausscheidung in der Gießener Klinik fortlaufend kontrolliert.

Die farblose, ebenfalls auf spektroskopischen Wege bestimmbare Vorstufe des Porphyrins ist in der Abhandlung von L. Heilmeyer genau beschrieben worden, ebenso seine Herkunft, sodaß ich auf diese Stelle verweisen kann.

Ueber den Gang der Porphyrinbestimmung ist bereits auf Seite 17 das Nötige gesagt worden. Ueber ihre spektrosko-

Abb. 3

Porphyrin im Harn.



a) in der normalen Bearbeitung; b) Porphyrin in $NaHCO_3$ gelöst.

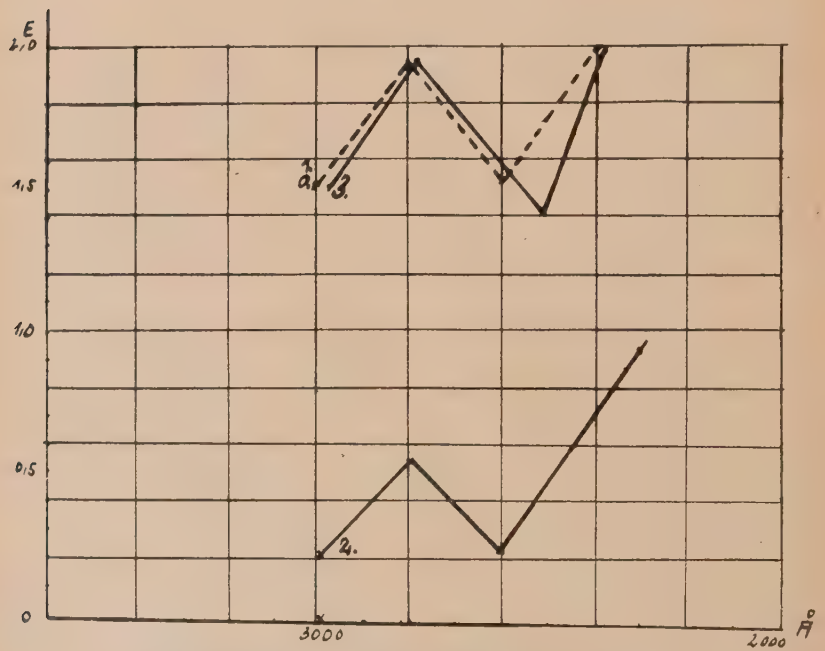
pischen Eigenschaften wäre zu erwähnen, daß die beiden in ihrem chemischen Aufbau etwas differenten Körper zwar eine Aehnlichkeit im Verlauf ihrer Kurven zeigen, aber nicht völlig übereinstimmen, wie man es auch erwarten sollte.

Ueber den eigentlichen Verlauf ist zu sagen, daß neben einer Absorption im Langwelligen bei 4100 Ä auch eine im Kurzwelligen [15]) auftritt, die unter Umständen die Absorption bei 2800 Ä beeinflussen kann. Die bei 4100 Ä, die sich immer durch ein gut ausgeprägtes Maximum geltend macht, kann bei Anwesenheit von größeren Mengen Urobilins Anlaß zu Fehlschlüssen über die wirklich vorhandene Menge von Porphyrin geben (Hejlmeyer). Mitbeteiligt an dieser Endabsorption ist übrigens noch die Urochromgruppe, sodaß man annimmt, daß beide Farbstoffgruppen wegen ihrer gleichen optischen Eigenschaften aus denselben Eiweißchromogen entstanden sind. Durch Zugabe von Chloroform kann man eine Trennung des Porphyrins vom Urobilin erzielen, wobei sich das Porphyrin im Chloroform auflöst.

Die Eiweißkörper.

Leider konnten besonderer Umstände wegen in dieser Gruppe nur die Anfangsuntersuchungen erledigt werden; sie sind einer besonderen Arbeit vorbehalten geblieben. Es ließ sich aber soviel erkennen, daß sie an der gesuchten Absorption nur einen geringen Anteil haben können. Ohne Zweifel absorbieren die einzelnen Eiweißkörper an dieser Stelle selektiv, wofür die mannigfaltigen Untersuchungen an Aminosäuren, aus denen sich ja die Eiweißkörper zusammensetzen, sprechen. Im gleichen Sinne verliefen auch die Untersuchungen an Eiweißkörpern in Reinsubstanz [16]), im Serum [17]), Ascites [18]) und im Liquor (s. Abb. 4).

Abb. 4.



1. Normalserum; 2. Liquor (normal); 3. Ascites
(aus Zeitschrift für experimentelle Medizin Bd. 81).

Sie alle zeigen eine scharfe, selektive Absorption bei 2800 Å und erreichen je nach Konzentration einen hohen Extinktionskoeffizienten. Maßgeblich für diese Absorption der zyklische Aminosäurenaufbau, zumal schon die Aminosäuren

in Reinsubstanz an dieser Stelle eine selektive Absorption geben. Auch bei ihnen übt das jeweils verwandte Lösungsmittel eine Veränderung des Absorptionsspektrums aus wie z. B. die Natronlauge, die die Kurve nach dem langwelligen Teil zu verschiebt (Gróh und Hanák [16]). Außerdem ist die Verschiebung noch abhängig von einer evt. auftretenden Reaktion zwischen Lösungsmittel und gelöster Aminosäure.

Aus unseren Untersuchungen ließ sich soviel entnehmen, daß ein Einfluß der Eiweißkörper auf die untersuchte Absorption nur gering sein kann; da wir dieselbe z. B. auch im Natronlaugenniederschlag in ziemlich unveränderter Weise wiederfinden, die Albumime aber wasserlöslich sind, kann man letztere schon außer Acht lassen. Bei den Globulinen verhält es sich ähnlich; sie sind in verdünnten Alkalien löslich, ebenso die Glukoproteide, sodaß sie schlecht in einem mit Natronlauge vorbehandelten Harn ausfallen können. Dazu sind die meisten nicht in Alkohol löslich, außer den Gliadinen (Prolaminen), für deren Vorliegen im normalen Harn kein Anlaß gegeben ist.

Wir kämen jetzt zu den Harnfarbstoffen, die vom Ammoniumsulfat nicht gefällt werden und daher in dem Filtrat zurückgeblieben sind. Der Farbstoff, den der Harn seine gelbe Farbe verdankt, sei an erster Stelle besprochen.

Urochrom und seine Vorstufen.

Untersucht man nämlich das Filtrat spektroskopisch, so findet man ebenfalls noch eine Absorption; sie verläuft langsam ansteigend im kurzwelligen Teil des Spektrums, ohne aber eine selektive Absorption aufzuweisen. Sie wird durch die sogenannten Restfarbstoffe des Harns hervorgerufen, unter denen das Urochrom mit seinen Vorstufen wegen seiner Verwandtschaft zum Urobilin und damit zu den Blutfarbstoffen die meiste Aufmerksamkeit verdient; ja, man nimmt heute sogar an, daß beide aus demselben Eiweißchromogen entstanden sind. Wahrscheinlich ist das Urochromogen, die Vorstufe des Urochroms, aus den Oxyproteinsäuren des Eiweißes entstanden und zwar als Stoffwechselprodukt aus dem Gewebszerfall; daher ist auch sein vermehrtes Auftreten im Harn zu erklären, wenn sich zerstörende Prozesse im Körper abspielen. Von seinen Vorstufen unterscheidet man mehrere Arten; sie zeigen untereinander verschiedenes Verhalten und weisen im Urochromogen A und B die bekanntesten Vertreter auf.

Zur Darstellung des Urochroms [19]), wenn auch mit mäßiger Ausbeute, behandelt man das Filtrat des Ammoniumsulfatniederschlages mit absolutem Alkohol, reinigt die alkoholische Lösung durch Zugabe von Wasser, sättigt wieder mit Ammoniumsulfat und entwässert den neuen alkoholischen Auszug mit festem Ammoniumsulfat bei leichten Erwärmen. Da die Lösung schwach alkalisch sein muß, setzt man ihr etwas Ammoniak zu und dampft nun auf dem Wasserbad bis zur Trockne ein. Zur Entfernung der mitgelösten Indoxylschwefelsäure wird der Rückstand mit Essigäther gewaschen, in absolutem Alkohol gelöst und in das gleiche Volumem Aether gegossen, wobei der Farbstoff als amorphes Pulver ausfällt; zu unseren Untersuchungen benutzten wir meist eine alkoholische Lösung des Urochroms. Es zeigt sich dann bei der Spektrophotometrie eine starke Endabsorption ohne besonderes Maximum. Setzt man die Lösung längere Zeit dem Einfluß des Luftsauerstoffs aus, dann zeigt sich zwar eine etwas steilere Kurve, die aber über den Rahmen einer parallelen Verschiebung nicht herausgeht. Vermutlich wird es sich bei diesem Phänomen um die Umwandlung einer Vorstufe handeln, die der Einwirkung des Sauerstoffes zuzuschreiben ist. Wir haben daher in vitro folgenden Versuch gemacht: Wir reduzierten eine Urochromlösung, die eine gelbe Farbe aufweist mit Wasserstoff, den wir uns aus Zink und Salzsäure herstellten. Dadurch verliert einmal die Lösung die gelbe Farbe; bei der darauffolgenden spektroskopischen Untersuchung dieser jetzt farblosen Lösung zeigt es sich, daß es zu einer erheblichen Abnahme der Absorptionsstärke gekommmen ist. Wir haben nun die Lösung über eine Nacht stehen gelassen; am nächsten Morgen hatte sich die gelbe Farbe wieder eingestellt und die Aufnahme zeigte den alten Extinktionskoeffizienten, ja manchmal sogar einen höheren.

Eine selektive Absorption aber mit einem gut ausgeprägten Maximum war nie zu finden.

Urorosein, Uroerythrin u. a.

Die Farbstoffe sind kurz besprochen. Einmal treten sie unter normalen Verhältnissen nicht auf; sind sie aber mal vorhanden, dann meist nur in so geringen Mengen, daß sie wohl kaum einen Einfluß auf den Ablauf der Absorptionskurve haben werden. Das Urorosein wiesen wir einmal bei einem Harn im Gang der Untersuchung rein zufällig nach; die spektrosko-

pische Aufnahme ergab nur eine unspezifische, geringfügige Absorption ohne erkennbares Maximum im Ultraviolett.

Ueber die optischen Eigenschaften der übrigen Harnbestandteile konnte noch kein abschließendes Urteil gewonnen werden.

Am Schlusse der Ausführungen seien noch der Bestandteile im Harn einige Worte gewidmet, die ihr Vorkommen einem mehr zufälligen Grunde verdanken; es war natürlich im Rahmen dieser Arbeit unmöglich allen Einzelfällen Rechnung zu tragen. Darunter fallen z. B. die im Harn auftretenden Abbauprodukte der Medikamente; unter ihnen absorbiert beispielsweise die Mekonsäure, ein Abbauprodukt des Opiums, bei 2800 Ä und ist so im Harn von Opiumsüchtigen, wo sie vermehrt auftritt, nachgewiesen worden. Weiter sind alle die Stoffe zu nennen, die unter pathologischen Umständen im Harn auftreten können. Von ihnen ist wohl der Harnzucker am meisten untersucht worden[20]); es ist heute noch nicht abzusehen, welcher Meinung zuzustimmen ist, da die Ansichten über eine selektive Absorption bei 2800 Ä noch sehr geteilt sind. Jedenfalls ist sie bei der in Betracht kommenden Zuckerkoncentration im Harn gegenüber der Absorption der Harnfarbstoffe gering. Schließlich bleibt noch übrig die Abhängigkeit der Absorption von anderen Faktoren als den bisher genannten zu untersuchen. Es ist z. B. gut denkbar, daß der Einfluß, den eine kolloidale Lösung auf die Verschiebung einer selektiven Absorption hat[21]), auch auf die Verhältnisse im Harn anzuwenden sind.

Zusammenfassung.

1. Es werden die Harnbestandteile untersucht auf ihren Einfluß auf eine selektive Absorption des Harns bei 2850 Ä, welche sich in jedem normalen Harn finden läßt.
2. Aus den Untersuchungen geht hervor, daß man der Harnsäure, wie man das auch im Blutserum gefunden hat, den größten Einfluß zubilligen muß. Andere Substanzen, die auch an dieser Stelle absorbieren, fallen einmal, wenn sie vorhanden sind, infolge ihrer rein gewichtsmäßigen Minorität weniger ins Gewicht. Andere wiederum treten nur unter pathologischen Verhältnissen auf; die selektive Absorption zeigt aber immer gleichmäßige Verhältnisse.
3. Aller Wahrscheinlichkeit muß im Harn auch ein gewisser Faktor für die Art der „Lösung“ in Rechnung gestellt werden.

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde in der medizinischen Klinik der Universität Gießen ausgeführt. Durch die Uebersiedlung von Herrn Professor Dr. Bohnenkamp und meinen Weggang von der Gießener Universität konnte die Arbeit erst in Erlangen zu Ende geführt werden.

Ich möchte nicht versäumen Herrn Professor Dr. Bohnenkamp für sein Entgegenkommen, die Arbeit an der hiesigen Fakultät referieren zu lassen, zu danken; Herrn Professor Dr. Greving bin ich für die Uebernahme des Referates sehr zu Dank verpflichtet.

Literaturverzeichnis

1) L. Heilmeyer: Med. Spektrophotometrie. Jena 1933.
2) s. u. 1).
W. Graubner: Quantitative spektr. Unters. i. ultraviol. Teil des Spektrums. Ztschr.f.exp.Med., Bd. 63, S. 527, 1928.
3) H. Ley: Handbuch der Physik, Bd. 21 S. 25 folg. 1929.
4) Toggenb. Annalen (Jubelband): S. 615, 1874. Wie. Annal. Bd. 4 S. 34, 1878.
5) s. u. 3), S. 87.
Behagel, Rothmann u. L. Schulze: Strahlenterapie Bd. 28 S. 110, 1928.
6) s. u. 3), S. 117.
7) Landolt-Börnstein'sche Tabellen: 2. Erg.Bd. 1931.
8) Chem. Ztrbl. I, 1588, 1928.
9) G. Huwer: Arch. Gynäk. Bd. 157, S. 524, 1934.
10) S. Edelbacher: Physiolog. Chemie, S. 234, 1936.
11) E. L. Gaber: Ferment. Spalt. d. Harnsäure i. Blutserum. Diss. Freiburg 1936.
12) E. Ziegler: Spektrophotometr. Unters. an Phosphatfäll. v. Urinen. Diss. Freiburg 1935.
13) Obermeyer und Popper: W.kl.Wschr. 1908, 898.
14) s. u. 1).
Holden, H. F. and C. Stanton Hicks: Ber. d. ges. Physiol. Bd. 72, S. 414, 1933.
15) Hausmann: Biochem. Ztschr. Bd. 186, S. 203, 1927.
Treibs: Hoppe Seyler Bd. 212, S. 33, 1932.
16) Abderhalden und Roßner: Hoppe Seyler Bd. 166 S. 78, 1927, Bd. 176 S. 249, 1928.
Anselow and M.-L. Forster: Chem. Ztrbl. 1932, I, 913.
Gróh und Hanák: Hoppe Seyler Bd. 190 S. 169, 1930.
F. Ellinger: Biochem, Ztschr. Bd. 215 S. 279, 1929.
17) Gróh und Weltner: Biochem. Ztschr. Bd. 273 S. 289, 1934.
18) Sährmann und Kollath: Bioch. Ztschr. Bd. 184 S. 216, 1927.
19) E. Spaeth: Die chem. u. mikr. Unters. d. Harns. 5. Aufl. 1924.
20) Gabryelski und Marchlewski: Ber. d. ges. Physiol. Bd. 73 S. 3, 1934.
Ramat, Lucas et Rabaté: Ber.d.ges.Physiol. Bd. 74 S. 105, 1933.
P. Niederhoff: Hoppe Seyler Bd. 165 S. 130, 1927.
21) Lange: Ztschr. physik. Chemie Abt. A. Bd. 159, S. 277.

Lebenslauf.

Am 21. Juli 1908 wurde ich als Sohn des Handelschemikers Dr. Heinrich Schmidt und seiner Ehefrau Helene, geb. Knauf, in Smejnogorsk (Westsibirien) geboren. Nach Besuch der Vorschule absolvierte ich das Gymnasium 1927 in Büdingen. Von meinen ersten 8 Semestern, die ich dem Studium der Chemie widmete, verbrachte ich die ersten beiden in Marburg, die übrigen in Würzburg, wo ich mich auch im Wintersemester 1929 dem ersten, im Wintersemester 1930/31 dem zweiten Verbandsexamen unterzog. Bereits in diesem Semester belegte ich medizinische Vorlesungen und bestand Ende des Sommersemesters 1932 in Gießen mein med. Vorexamen. Nach einem Semester in Innsbruck verbrachte ich die übrigen 5 Semester in Gießen, wo ich am 20. Juni 1935 mein medizinisches Staatsexamen ablegte. Mein Medicinal-Praktikantenjahr verbrachte ich in Bad Nauheim (Städt. Krankenhaus und Koniţkystift) und in Heilbronn (Chirurgische und Strahlenabteilung des Städt. Krankenhauses). Am 1. Aug. 1936 wurde ich approbiert; vom Ende meines Medizinalpraktikantenjahres bis Ende März 1937 blieb ich an der Röntgenabteilung in Heilbronn und befinde mich seit 1. April 1937 an der hiesigen medizinischen Klinik.